

W.H

REC'D 10 DEC 1999

PCT/JP99/05090

WIPO

PCT

30.11.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

09/554519

EJU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 9月18日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第263763号

出 願 人

Applicant (s):

エーザイ株式会社

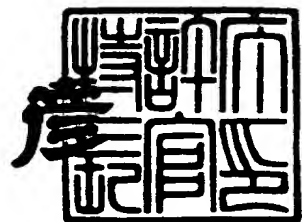
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月12日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3078765

【書類名】 特許願

【整理番号】 EP98SY0902

【提出日】 平成10年 9月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N30/60

【発明の名称】 試料中の成分濃縮用カラム

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 9-7-509

    【氏名】 村田 薫

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市松ヶ丘 1-5-3

    【氏名】 真野 成康

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市並木 3-26-13

    【氏名】 浅川 直樹

【特許出願人】

    【識別番号】 000000217

    【郵便番号】 112

    【住所又は居所】 東京都文京区小石川 4丁目 6番 10号

    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

    【代表者】 内藤 晴夫

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 004983

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 図面 1

特平 1 0 - 2 6 3 7 6 3

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 試料中の成分濃縮用カラム

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高速液体クロマトグラフィー用カラムにおいて、目的成分を拡散する膜及び目的成分を吸着する膜から成る成分濃縮用カラム。

【請求項2】 高速液体クロマトグラフィー用カラムにおいて、目的成分を吸着する膜の片側又は両側に、目的成分を拡散する膜を配置した成分濃縮用カラム。

【請求項3】 目的成分を拡散する膜が、焼結フィルター、セラミック、金属メッシュ又はセルロース繊維である請求項1又は2記載の成分濃縮用カラム。

【請求項4】 目的成分を吸着する膜が、スチレン樹脂、シリカゲル、イオン交換樹脂又はこれらを化学修飾した物質を含有する膜である請求項1又は2記載の成分濃縮用カラム。

【請求項5】 図1中、送液ポンプ(P1)、インジェクター(I)、切替バルブ(V)、請求項1又は2記載の成分濃縮用カラム(M)、切替バルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替バルブ(V)の順に連結し、別のラインにより送液ポンプ(P2)、切替バルブ(V)、分離カラム(C)及び検出器(D)を連結した高速液体クロマトグラフィー。

【請求項6】 図2中、送液ポンプ(P1)、切替バルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替バルブ(V)を連結し、別のラインにより送液ポンプ(P2)、切替バルブ(V)、分離カラム(C)及び検出器(D)を連結し、更に別のラインにより切替バルブ(V)、請求項1又は2記載の成分濃縮用カラム(M)及び切替バルブ(V)を連結した高速液体クロマトグラフィー。

【請求項7】 請求項5記載の高速液体クロマトグラフィーにおいて、送液ポンプ(P1)により送られる移動相により目的成分を請求項1又は2記載の成分濃縮用カラム(M)に捕捉し、切替バルブを切替えることにより、送液ポンプ(P2)により送られる移動相により目的成分を流出させる試料中微量成分の分析方法。

【請求項 8】請求項 6 記載の高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分を請求項 1 又は 2 記載の成分濃縮用カラム (M) に注入し、この時送液ポンプ (P 1) により溶媒ミキシング装置 (MC) に溶媒を充填して置き、切替えバルブを切替えることにより、ポンプ (P 2) により送られる移動相により目的成分を流出させる試料中微量成分の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、高速液体クロマトグラフィー用成分濃縮カラム、高速液体クロマトグラフィーシステム及び試料中微量成分の分析方法に関する。

【0002】

【発明の背景及び従来技術】

高速液体クロマトグラフィーは、試料中の微量成分の分析に汎用されており、近年では質量分析装置と組合わせることにより、成分の分離と同定を高感度に行うシステムも用いられている。例えば、特開平 3-175355 号公報には、高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法及装置及びトラッピングカラムに試料中の目的成分を捕捉する装置が開示されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

質量分析計に送られる液量は数十  $\mu$ L が限度であるため、高速液体クロマトグラフィー質量分析計における高速液体クロマトグラフィーの送液量は質量分析計の許容流量以下である必要がある。従来用いられているシステムのトラッピングカラムではデッドボリュームが大きいため、質量分析計の限度以下の量を送液したのでは質量分析計まで目的成分が達するのに長時間を要し、事実上分析不可能であった。また、トラッピングカラムは微粒子の充填剤が充填されているため、試料をトラッピングカラムに送る際には送液ポンプにより高圧をかける必要があった。本発明者はこれら従来システムの有する課題を解決すべく鋭意検討した結果、以下に示す構成により課題を解決できることを見出し本発明を完成した。

【0004】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、高速液体クロマトグラフィー用カラムにおいて、目的成分を拡散する膜及び目的成分を吸着する膜から成る成分濃縮用カラムである。また、本発明は、図1中、送液ポンプ(P1)、インジェクター(I)、切替バルブ(V)、拡散膜及び吸着膜からなる成分濃縮用カラム(M)、切替バルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替バルブ(V)の順に連結し、別のラインにより送液ポンプ(P2)、切替バルブ(V)、分離カラム(C)及び検出器(D)を連結した高速液体クロマトグラフィーである。本発明はまた、上記高速液体クロマトグラフィーにおいて、送液ポンプ(P1)により送られる移動相により目的成分を、拡散膜及び吸着膜からなる成分濃縮用カラム(M)に補足し、切替バルブを切替えることにより、送液ポンプ(P2)により送られる移動相により目的成分を流出させる試料中微量成分の分析方法である。

## 【0005】

さらに、本発明は、図2中、送液ポンプ(P1)、切替バルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替バルブ(V)を連結し、別のラインにより送液ポンプ(P2)、切替バルブ(V)、分離カラム(C)及び検出器を連結し、更に別のラインにより切替バルブ(V)、拡散膜及び吸着膜からなる成分濃縮用カラム(M)及び切替バルブ(V)を連結した高速液体クロマトグラフィーである。本発明はまたこの高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分を拡散膜及び吸着膜からなる成分濃縮用カラム(M)に注入し、この時送液ポンプ(P1)により溶媒ミキシング装置(MC)に溶媒を充填しておき、切替バルブを切替えることにより、ポンプ(P2)により送られる移動相により目的成分を流出させる試料中微量成分の分析方法である。

## 【0006】

本発明において、目的成分を拡散する膜とは、焼結・・・、セラミック、金属メッシュ又はセルロース繊維等でできた膜であり、高速液体クロマトグラフィーの移動相及び目的成分がこの膜を通過する際に、膜全体に拡散される。一方、目的成分を吸着する膜とは、スチレン樹脂、シリカゲル、イオン交換樹脂又はこれらを化学修飾した物質を含有する膜である。化学修飾とはこれら物質の表面に化学

物質を結合させることにより、表面の性質を変化させることであり、例えば、シリカゲル表面に存在する親水性を有するシラノール基にアルキル基、フェニル基等を結合させることによりシリカゲル表面を疎水的な性質に変化させることや、シリカゲルにイオン交換基（スルホン基、カルボン酸基、アミノ基等）を導入したイオン交換機能を保有させる等の化学修飾を挙げることができる。この膜への目的成分の吸着は、膜の性質と高速液体クロマトグラフィーの移動相組成に依存する。即ち、移動相の組成を変化させることにより、目的成分は吸着膜に吸着することもできるし、脱離することもできる。本発明における「濃縮」とは「吸着」とほぼ同義である。即ち、試料中の目的成分が吸着膜に吸着することにより吸着膜上において目的成分が試料溶液又は移動相溶液から濃縮されるのである。

#### 【0007】

本発明にかかる拡散膜及び吸着膜の直径は通常2～30mmである。拡散膜の厚さはその材質により一概に言えないが、通常0.2～3mmである。吸着膜の厚さはその材質により一概に言えないが、通常0.2～2mmである。

拡散膜と吸着膜は相接していてもよく、離れていてもよいが、両者の間隔が離れすぎると乱流が起こり、分析精度が悪くなるため1mm以下であることが望ましい。本発明においては吸着膜の両側に拡散膜を設置することができる。これによりカラムのどちら側から移動相を流しても試料成分が拡散されて吸着膜に達するためカラムの接続方向を気遣う必要がなく便利である。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

本発明にかかる拡散膜及び吸着膜は容器内に設置される。容器の材質は特に限定されないが、通常はステンレススチール製である。膜の設置にあたっては移動相が漏れることを防ぐためにOリングを用いることが好ましい。また、容器内部の移動相の流路は、拡散膜に向かってテーパ状に広がっていることが好ましい。移動相の拡散膜中における拡散を容易にするためである。図3に本発明にかかる成分濃縮用カラムの概念図を示した。図中、Fは目的成分を拡散する膜、AMは目的成分を吸着する膜、OはOリング、Pはパッキンであり、ステンレス製の容器Sに収納されている。

## 【0009】

本発明における成分濃縮用カラムは以下のように構成された高速液体クロマトグラフィーとすることにより、微量成分の高速・高感度分析に適したシステムとなる。本システムを図1により詳細に説明する。図1は高速液体クロマトグラフィーの模式図であり、送液ポンプ（P1）、インジェクター（I）、切替バルブ（V）、拡散膜及び吸着膜からなる成分濃縮用カラム（M）、切替バルブ（V）、溶媒ミキシング装置（MC）及び切替バルブ（V）が順に連結され、別に送液ポンプ（P2）、切替バルブ（V）、分離カラム（C）及び検出器（D）が連結されている。この高速液体クロマトグラフィー・システムにおける成分の濃縮・分離方法は次のようである。

## 【0010】

（A）送液ポンプ（P1）から膜濃縮用移動相を送出し、インジェクター（I）から試料溶液を注入し、膜濃縮用移動相で試料溶液を希釈しながら膜へ試料を送液して試料中の目的成分を膜に捕捉させる。同時に膜濃縮用移動相で、溶媒ミキシング装置を満たす。膜濃縮用移動相とは、吸着膜に目的成分を吸着させるための移動相であり、吸着膜が疎水的性質を有する場合には、水／メタノール等の比較的極性の大きな溶媒である。

## 【0011】

（B）次に、送液ポンプ（P2）から送出される試料分離用移動相をバルブ（V）を切替えて溶媒ミキシング装置（MC）、膜濃縮装置（M）、分離用カラム（C）および検出器（D）を経て排出させる。試料分離用移動相とは、吸着膜から試料成分を離脱させ、さらに分離用カラムにおいて試料成分を分離するための移動相であり、吸着膜が疎水的性質を有する場合は、例えば水／アセトニトリル等の、膜濃縮用移動相より極性の小さな溶媒である。この時、膜濃縮用移動相と試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置（MC）にて混合し、両者の移動相の混合にグラディエントを形成させながら膜濃縮装置に送液し、捕捉した試料中の目的成分を脱離させ、分離用カラム（C）で分離し、検出器（D）により目的成分を検出する。膜濃縮用移動相の流れる方向と試料分離用移動相の流れる方向は反対になる。溶媒ミキシング装置（MC）を使用し、膜濃縮用移動相と試料分離用



移動相の混合にグラディエントを形成することにより、分離用カラムにおける目的成分の分離能が著しく向上するが、これが本システムの特徴の一つである。

【0012】

ここでポンプとは高速液体クロマトグラフィー用の送液ポンプであり、バルブとは高速液体クロマトグラフィー用の十方バルブ、六方バルブ等である。インジェクターとは高速液体クロマトグラフィー中に試料溶液を注入するための装置であり、分離カラムとは試料中の目的成分を分離するためのカラムであり、目的に応じていわゆる順相カラム、逆相カラム等を適宜選択できる。これら装置は市販のものを使用することができる。

【0013】

本発明にかかる高速液体クロマトグラフィーの別のシステムを図2により説明する。図2は、高速液体クロマトグラフィーの模式図であり、送液ポンプ（P1）、切替えバルブ（V）、溶媒ミキシング装置（MC）及び切替えバルブ（V）が順に連結され、別に送液ポンプ（P2）、切替えバルブ（V）、分離カラム（C）及び検出器が連結され、更に別のラインにより切替えバルブ（V）、拡散膜及び吸着膜からなる成分濃縮用カラム（M）及び切替えバルブ（V）が連結されている。

【0014】

図2に示すシステムにおける成分の濃縮・分離方法は次のようである。

（A）移動相1が送液ポンプ（P1）から送出され、ミキシングチャンバー（MC）を満たす。十方バルブ（V）に装着された本発明にかかる成分濃縮用カラムに、十方バルブのインジェクションポートから試料溶液を注入し、試料中の目的成分を上記成分濃縮用カラムに捕捉させた後、更に適当な溶媒で目的成分を膜から脱離させないようにして洗浄する。

（B）次に、バルブ（V）を切替えてポンプ（P2）から試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置（MC）、成分濃縮用カラム、分離用カラム（C）及び検出器（D）へと送液する。この時、移動相1と試料分離用移動相をミキシングチャンバー中で混合し、両者の混合にグラディエントを形成させながら、成分濃縮用カラムに送液し、捕捉した試料中の目的成分を脱離させ、分離用カラム（C）で分

離する。この時、成分濃縮用カラムを通過する試料分離用移動相の流路は、試料溶液を注入した方向と反対方向である。溶媒ミキシング装置の働きは前述の通りであり、本発明の特徴の一つであるが、更に、図2に示すシステムでは、試料溶液を成分濃縮用カラムに手動で注入することができるが、これは本発明にかかる成分濃縮用カラムが移動相、試料溶液等の通過に対して圧力がかからないために可能となった顕著な効果であり、試料溶液の大量処理、成分の高速濃縮を可能とするものである。

【0015】

## 【発明の効果】

本発明にかかる成分濃縮用カラムは、デッドボリウムが小さいため特にマイクロ液体クロマトグラフィーに適している。即ち従来の高速液体クロマトグラフィーで使用される移動相流量（数ml/min）より極めて少ない流量（数十 $\mu$ l/min）でも試料成分の濃縮、分離が可能であり、直接、質量分析計への接続も可能となる。また、移動相・試料溶液の通過に際してかかる圧力が極めて小さいため、高速濃縮が可能であり、また、試料溶液の手動注入も可能となる。

さらに、本発明にかかる成分濃縮カラムを装着した高速液体クロマトグラフィーシステムは試料溶液中の目的成分の濃縮・分離を極めて容易に行うことができる。

図2に示す本願発明にかかるシステムにより得られたクロマトグラムを図4に示すが、このクロマトグラムは従来の高速液体クロマトグラフィーによっては得ることができないものであり、本願発明の顕著な効果を示すものである。

【0016】

図4のクロマトグラムは、次の分析条件により得られたものである。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：254nm）

分離用カラム：Inertsil ODS-2(0.7mm I.D.×150mm)

膜濃縮用移動相：0.1%酢酸アンモニウム水溶液

試料分離用移動相：0.1%酢酸アンモニウム含有アセトニトリル・エタノール混液  
(500:500)

流量：膜濃縮用 1.0ml/min

試料分離用 0.025ml/min

試料成分は、安息香酸 n-プロピル、安息香酸ベンジル、安息香酸 n-ブチル及び安息香酸 n-ヘキシルをそれぞれ  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように 10% アセトニトリル水溶液に溶解した。試料の注入量は、 $10 \mu\text{L}$  である。

【0017】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 高速液体クロマトグラフィーの模式図である。

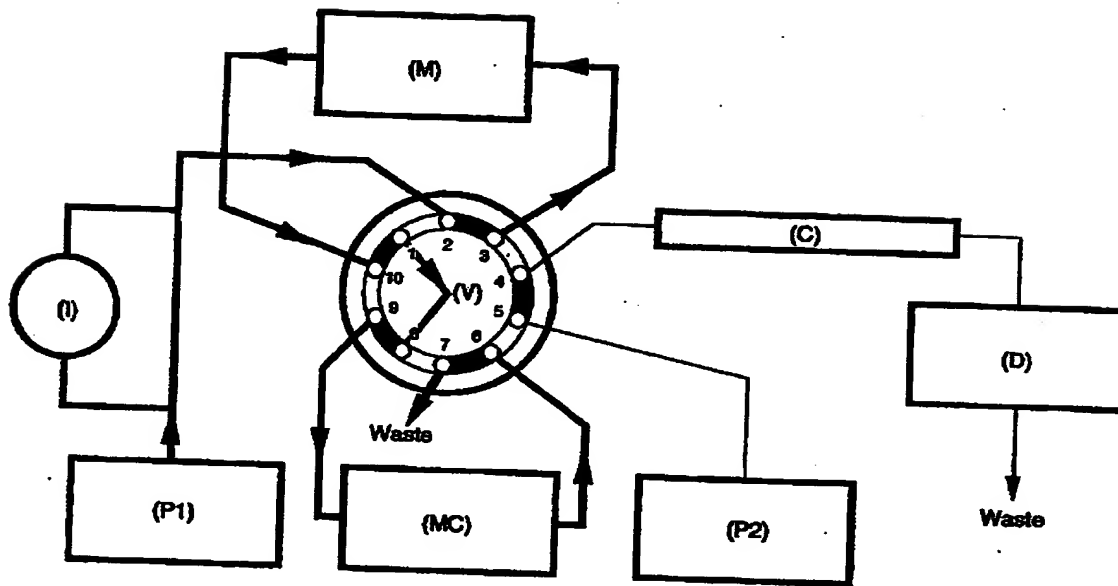
【図 2】 高速液体クロマトグラフィーの模式図である。

【図 3】 成分濃縮用カラムの模式図である。

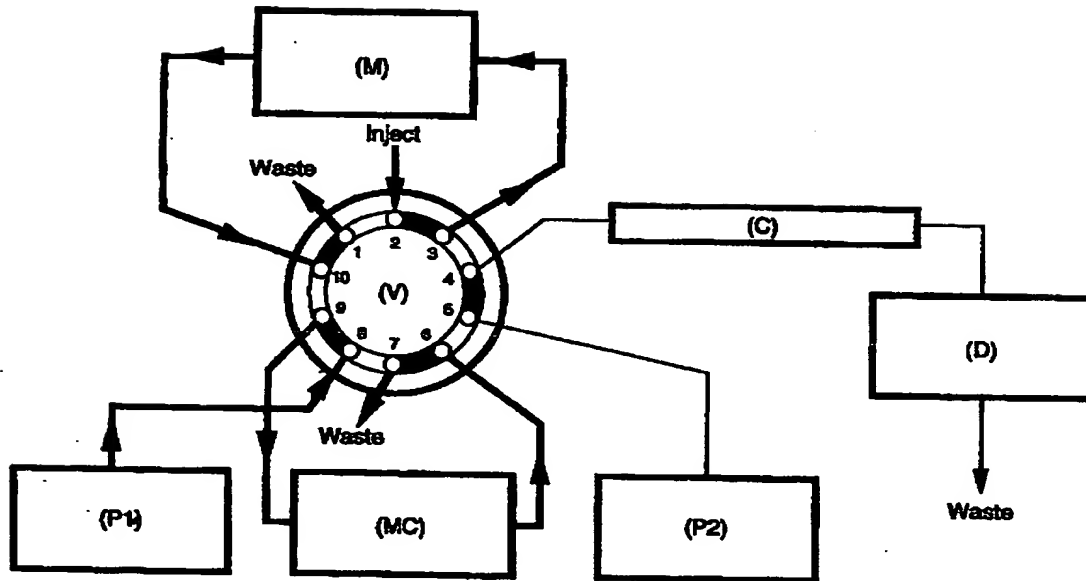
【図 4】 本願発明にかかる高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

【書類名】 図面

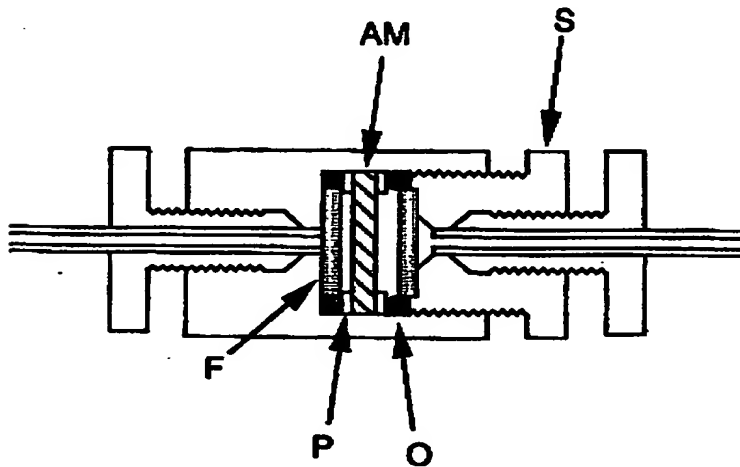
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図4】

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=12 クロマト=1:MICRO.C00



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の成分濃縮用カラムを提供する。

【解決手段】 本発明は高速液体クロマトグラフィー用カラムにおいて、目的成分を拡散する膜及び目的成分を吸着する膜からなる成分濃縮用カラムである。本カラムは特にマイクロ液体クロマトグラフィーに有用である。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000000217

【住所又は居所】

東京都文京区小石川4丁目6番10号

【氏名又は名称】

エーザイ株式会社



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名 エーザイ株式会社

THIS PAGE RI ANK (ASPTO)